

- 1 -

Método para la identificación de especies biológicas

La presente invención se refiere al campo del análisis taxonómico de muestras biológicas, basándose en el uso de la secuencia de DNA de una proteína muy conservada evolutivamente.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

El análisis taxonómico de muestras es aplicable a un amplio espectro de industrias y actividades. Las tres áreas mayoritarias de aplicación del análisis taxonómico son:

Análisis de productos alimentarios y monitorización de las cadenas de producción de estos productos

La demanda de tests que proporcionen trazabilidad del origen taxonómico de muestras biológicas o productos alimentarios ha crecido desde la crisis del sector alimentario en respuesta al foco epidemiológico de la Encefalitis Espongiforme Bovina en el Reino Unido y la tendencia creciente de mezclar ilegalmente carnes de diversas procedencias taxonómicas sin el correspondiente etiquetado del producto final. Por ejemplo, se ha descrito que carne de origen bovino se había estado sistemáticamente añadiendo a productos de pollo importados a Holanda desde todas partes del mundo, y distribuidos por toda Europa. Otras formas de adulteración han sido reportadas y se cree que podrían ser de práctica generalizada en la industria de este sector, pero que son de difícil detección sin la aportación de técnicas avanzadas basadas en análisis de DNA.

Los tests de seguridad en productos alimentarios se realizan normalmente en laboratorios gubernamentales, industrias del sector de la alimentación y compañías de servicio de estas industrias. Actualmente, y de una forma cada vez más frecuente, los usuarios de este sector están contratando métodos de control en respuesta a la creciente demanda de los clientes. En este sentido, ciertas cadenas de supermercados han establecido colaboraciones con compañías tecnológicas para el desarrollo de métodos de trazabilidad del origen taxonómico de productos cárnicos basados en técnicas genéticas.

En una aplicación relacionada, el análisis de alimentos animales es una prioridad de

- 2 -

- la Agenda Europea de Agricultura, en especial tras la crisis de las “vacas locas” con los piensos animales. El análisis de alimentos es altamente deseable y puede ser obligatorio en un futuro cercano. Actualmente la vigilancia se basa en el mantenimiento de registros pero no abarca las prácticas de adulteración ilegal o diluciones que se realizan indiscriminadamente en muchas partes del mundo.

Vigilancia y monitorización de biodiversidad

- La biodiversidad es el resultado de las interacciones entre la historia filogenética de la vida sobre la tierra y los procesos evolutivos. Como tal, la biodiversidad es la suma de la vida en la tierra e incluye diversidad genética, de especies y funcional.

- Uno de los primeros pasos en los programas de monitorización de la biodiversidad es el inventario taxonómico, detallando todos los taxones y su sistemática en un ecosistema concreto que incluye animales, plantas y microorganismos. Estos inventarios aportan la base de toda vigilancia de biodiversidad y de los programas de conservación. La biodiversidad global es extremadamente vasta: Existen actualmente 52.629 especies diferentes de vertebrados, 4,63 millones de especies invertebradas y 265.876 especies de plantas y hongos descritos (cifras extraídas de ‘redlist’).

- El DNA se está aceptando cada vez más como el medio para monitorizar la biodiversidad. Por ejemplo, el DNA extraído de pelaje encontrado en bosques canadienses en 2002 se utilizó para confirmar que el Lince salvaje todavía existe en la región de los grandes lagos.

Vigilancia y monitorización de especies en peligro de extinción.

- Existen actualmente unas 8.000 especies de animales y plantas en las listas oficiales de especies en peligro de extinción, y esta cifra crece cada año. Esta tendencia identifica la necesidad de tests de fácil manejo y de uso “universal” para la identificación del origen taxonómico de muestras biológicas.

- El comercio de productos elaborados a partir de especies en peligro de extinción se controla bajo la convención del comercio internacional de especies en peligro (CITES, Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and

- 3 -

Flora) y actualmente se están desarrollando tests de DNA auspiciados por esta organización para la monitorización de este comercio ilegal. Es particularmente importante la detección de productos animales o vegetales procesados, tales como alimentos o cosméticos, más que la materia animal prima como las pieles, que no precisan de tests de DNA para su identificación. Un ejemplo de esto es la utilización de polvo de diente de tigre utilizado ampliamente en medicinas tradicionales, a pesar del estado declarado de peligrosidad de supervivencia de la especie. Tests de DNA han sido utilizados para la identificación de material de tigre basados en la secuencia del gen del citocromo b en DNA amplificado y tests similares se han descrito para trazar carne de ballena originaria de grupos protegidos en productos procesados que aparentemente contenían carne "legal" de ballena. Enfoques similares se han aplicado a orquídeas protegidas, serpientes y cocodrilos en productos destinados al consumo humano, el origen de caviar a partir de esturiones protegidos, etc. Es muy probable que el uso de este tipo de tecnologías para la monitorización de especies en peligro de extinción sufra un gran aumento en un futuro próximo.

Tecnología aplicada en el análisis taxonómico de muestras

La metodología empleada en la determinación del origen animal de muestras biológicas se deriva principalmente de la industria alimentaria y del sector de los productos cárnicos. De los métodos tradicionales basados en análisis electroforéticos y/o inmunoquímicos de proteínas se ha avanzado hacia el análisis del contenido de DNA de las muestras alimenticias para identificar inequívocamente la naturaleza del producto. Se trata de métodos de identificación de ácidos nucleicos mediante la hibridación de sondas específicas para una especie concreta y/o la amplificación selectiva de las secuencias objetivo mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, "Polimerase chain reaction").

La amplificación se ha dirigido a segmentos de DNA mitocondrial (cfr. Bartlett et al. BioTechniques 1992 vol.12 pp.408-411; Unseld et al. Genome Research 1995 vol.4 pp.241-243; Palumbi et al. J. Hered. 1998 vol.89 pp.459-464; Wolf et al. J. Agricult and Food Chem. 1999 vol.47 pp.1350-1355; Partis et al. Meat Science 2000 vol.54 pp.369-376). Este método no es adecuado para la determinación de muestras con un origen taxonómico dual o heterogéneo. La amplificación también se ha dirigido a DNA nuclear (cfr. Janssen et al. J. Ind. Microbiol. and Biotech. 1998 vol.21 pp.115-120, Matsunaga et al. Meat Science 1999 vol.51 pp.143-148; Wolf and Lüthy Meat

- 4 -

Science 2001 vol.57 pp.161-168). Proteínas de destacada importancia han sido la DNA-Topoisomerasa Tipo II (cfr. US 5.645.994) y la α -actina cardíaca (cfr. Fairbrother et al. Meat Science 1998 vol.50 pp.105-114; Fairbrother et al. Animal Biotech. 1998 vol.9 pp.89-100; Lockley and Bardsley Meat Science 2002 vol.61 pp.163-168).

Algunos métodos se basan en una PCR donde un primer oligonucleotídico es genérico y el otro es dependiente de la especie que se desea identificar, y es de cierta utilidad en la discriminación de las especies cárnicas de mayor consumo (cfr. Matsunaga et al. Meat Science 1999 vol.51 pp.143-148). Otros métodos se han diseñado para la confirmación de la presencia de DNA derivado de especies porcina (cfr. Montiel-Sosa et al. J. Agric. Food Chem. 2000 vol.48 pp.2829-2832), bovina, avestruz y emú (cfr. Colombo et al. Meat Science 2000 vol.56 pp.15-17) en muestras biológicas pero el problema surge en caso de no confirmación ya que esta tecnología no aporta datos sobre la identidad taxonómica de la muestra analizada.

El documento más cercano a la presente invención es la patente US 5.645.994 que describe un método para amplificar selectivamente segmentos de DNA de uno o más organismos en una muestra mediante el uso de secuencias del gen de la DNA-Topoisomerasa Tipo II.

Sin embargo, por el momento todos estos métodos resultan limitados cuando la muestra comprende una mezcla de organismos. Solamente confirmarían la presencia de un organismo preconocido o sospechado y no permitirían la identificación de cada uno de los organismos presentes.

Sería deseable poder encontrar la manera de identificar una pluralidad de organismos en una sola muestra sin el uso de múltiples sondas y sin previo conocimiento de los organismos que podrían estar presentes. Otro punto a mejorar es poder distinguir especies muy similares o relacionadas entre sí.

DEFINICIONES

A los efectos de la presente descripción conviene realizar las siguientes definiciones:

Proteína ubicua: proteínas con similar estructura y función que son presentes en

- 5 -

muchos o todos los organismos. Una proteína con estas características será homóloga a la proteína equivalente de otra especie.

5 Segmento conservado: Empleado tanto para segmentos aminoacídicos como nucleotídicos. Que presenta segmentos sustancialmente o enteramente compartidos entre las distintas especies. El grado "alta" conservación indica que la proporción de segmentos compartidos entre varias especies es alto. Se habla entonces de secuencia consenso.

10 Segmento divergente: Empleado tanto para segmentos aminoacídicos como nucleotídicos. Que presenta segmentos sustancialmente distintos entre especies. En este documento también se utilizará el término "target" para designar estas secuencias.

15 EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

Gran parte de las limitaciones anteriormente indicadas se superan con la presente invención. En este sentido, los inventores de la presente invención han encontrado sorprendentemente que el gen que codifica la proteína beta-actina citoplasmática y sus productos derivados son útiles para la identificación taxonómica a partir de muestras de material biológico cuya procedencia es una única especie o una mezcla heterogénea de especies y/o subespecies.

25 La presente invención aporta un método de identificación de especies y subespecies en una muestra biológica, cuya procedencia es una única especie o una mezcla heterogénea de especies y/o subespecies, mediante la amplificación selectiva de segmentos de ácido nucleico que codifican una región target de una macromolécula presente en todos los organismos de interés, para lo cual, según un primer aspecto, la presente invención tiene por objeto un método que comprende un paso de extracción del DNA de la muestra; un paso de amplificación por PCR o técnica equivalente de segmentos del gen de la beta-actina citoplasmática; y un paso de identificación del segmento amplificado por comparación de su tamaño en pares de bases con un patrón de tamaños preestablecido y/o identificación del segmento amplificado por secuenciación de DNA y comparación de la secuencia resultante con la secuencia específica de cada especie o subespecie presente en una base de datos informática.

- 6 -

El paso de amplificación del DNA de partida no está restringido al uso de la PCR, sino que puede usarse cualquier técnica equivalente que un experto en la materia pudiera desarrollar con las herramientas actuales a su disposición. De igual manera,
5 por ejemplo, la visualización del resultado de la PCR no está restringido al uso de la electroforesis en agarosa, sino que también podría ser útil la electroforesis capilar, una electroforesis automatizada o cualquier técnica equivalente que presentase una mínima resolución para llevar a cabo el experimento con éxito.

10 Preferentemente, las regiones a amplificar son segmentos génicos divergentes del gen de la beta-actina citoplasmática a partir de secuencias de DNA con alta conservación evolutiva entre especies y subespecies. Y más particularmente, las regiones a amplificar son aquellas comprendidas entre la secuencia 3' del exón anterior y la secuencia 5' del exón posterior comprendiendo toda la secuencia
15 intrónica y parte de las secuencias exónicas flanqueantes.

En una realización particular de este método, las regiones a amplificar son las comprendidas entre las posiciones 1130-1473, 1452-2063, 2438-2680 y/o 2642-2960 (numeración con respecto a la secuencia de DNA del locus humano HUMACCYBB
20 Accession number M10277, Genbank). Particularmente, las muestras son de tejido animal, y más concretamente de caballo, cabra, conejo, perro, gato, chimpancé, humano y/o oso pardo. En otra realización, las muestras son de tejido vegetal.

En otra realización particular de este método, en el paso de identificación, el
25 segmento o segmentos amplificados son comparados con la secuencia humana M10277 y/o con las secuencias de estas mismas regiones génicas de especies incluidas en una base de datos informática. Los segmentos amplificados muestran las zonas conservadas en los extremos de cada segmento amplificado y la región central de divergencia correspondiente en su mayoría a la región intrónica del gen.

30 La presente invención aporta la manera de identificar una pluralidad de organismos en una sola muestra sin el uso de múltiples sondas específicas para cada una de las especies y subespecies susceptibles a estar presentes en la muestra. Se utilizan primers universales, que son válidos para la identificación de cualquier especie o
35 subespecie presente en la muestra sin previo conocimiento de los organismos que podrían estar presentes. Según la invención, se usa una composición de primers

- 7 -

universales que hibridan con las regiones conservadas del gen de la beta-actina citoplasmática, preferiblemente con las secuencias comprendidas entre las posiciones 1130-1191 y 1453-1473; 1453-1473 y 2041-2065; 2433-2459 y 2643-2680 y/o 2643-2680 y 2940-2960 (numeración con respecto a la secuencia de DNA del locus humano HUMACCYBB Accession number M10277). Particularmente, las parejas de primers universales utilizados son P1 (1132-1151) 5'TCCGGCATGTGCAAGGCCGG3' y P2 (1474-1454) 5'CTCCATGTCGTCCCAGTTGG3'; P3 (1453-1484) 5'ACCAACTGGGACGACATGGAGAAGATCTGGC3' y P4 (2063-2034) 5'TACATGGCNGGGGTGTTAAAGGTCTCAAAC3', P5 (2434-2463) 5'TGCCCTGAGGCCCTCTTCCAGCCTTCCTTC3' y P6 (2681-2643) 5'GGGTACATGGTGGTGCCGCCAGACAGCACNGTGTGGC3'; y P7 (2643-2681) 5'GCCAACACNGTGCTGTCTGGCGGCACCACCATGTACCC3' y P8 (2952-2932) 5'TCGTACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTG3'.

15

De acuerdo con un segundo aspecto, otro objeto de la presente invención es el uso de las secuencias de DNA del gen de la beta-actina citoplasmática de muestras biológicas de una única especie de procedencia o de una mezcla heterogénea de especies y/o subespecies, para la identificación de las especies biológicas a las que pertenecen las muestras.

20

La proteína beta-actina citoplasmática cumple con varios criterios para realizar una identificación fiable. Es una proteína ubicua en todos los organismos de interés. La beta-actina citoplasmática es una de las seis isoformas diferentes de la actina identificadas hasta el momento. Concretamente, la beta-actina citoplasmática es una de las dos actinas citoesqueléticas no musculares. Su función es la de permitir la movilidad y proporcionar estructura e integridad a la célula, siendo un componente mayoritario del aparato contráctil celular. Es por todo ello que es una proteína fundamental para la supervivencia de la célula, y ello se traduce en que presenta segmentos exónicos con una alta conservación evolutiva entre especies. El grado de homología en su secuencia aminoacídica entre especies es de entre un 98% y un 100%, adecuado para presentar segmentos muy conservados pero también segmentos divergentes en las partes no codificantes del gen para la correcta distinción entre especies muy relacionadas entre sí. La divergencia nucleotídica correspondiente por ejemplo al intrón B de las especies estudiadas (1216-1347 bp, numeración con respecto a la secuencia de DNA del locus humano HUMACCYBB

35

- 8 -

Accession number M10277) es menor del 25%. Los segmentos altamente conservados entre las diferentes especies y subespecies permiten el uso de primers comunes para todas las especies y subespecies, mientras que los segmentos divergentes son el objeto de amplificación mediante los primers citados, resultando en un patrón de amplificación distinto para cada especie y subespecie.

Además de la identificación cualitativa de las especies presentes en una muestra desconocida, un aspecto de la presente invención se refiere al análisis cuantitativo de las especies presentes. Este aspecto es relevante por ejemplo en la determinación de niveles de contaminación de una muestra con material procedente de otra especie. En muchos casos, un resultado cualitativo será suficiente (por ejemplo: la carne de pollo ha sido adulterada con productos bovinos?) pero en otros casos una respuesta cuantitativa será necesaria (qué cantidad de vacuno se ha añadido a la carne de pollo?) Esto es particularmente relevante cuando ciertos aditivos se aceptan bajo límites especificados.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. El resumen de esta solicitud se incorpora aquí como referencia.

Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes realizaciones particulares y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 muestra una representación esquemática de la estructura del gen de la beta-actina citoplasmática humana. Las cajas representan los exones (exón 1 a 6) y la raya negra continua los intrones (I, Intrón A a E). Las regiones W, X, Y y Z corresponden a regiones comprendidas entre las parejas de primers P1 y P2, P3 y P4, P5 y P6, y, P7 y P8 respectivamente. Estos fragmentos (W, X, Y y Z) incluyen secuencias de DNA divergentes entre diferentes especies biológicas y amplificables por PCR a partir de los primers P1 a P8 ejemplificados en la figura 2.

La figura 2 muestra en detalle los primers oligonucleotídicos ilustrados en la figura 1.

La numeración corresponde a su posición sobre la secuencia genómica del gen de la beta-actina humana (referencia de acceso a Genbank: M10277; Locus: HUMACCYBB). A: Adenina, C: Citosina, G: Guanina, T: Timina. N: posición con degeneración nucleotídica.

5

Figura 3. Parte superior de la figura: muestra la secuencia aminoacídica parcial de la proteína beta-actina citoplasmática de tres especies diferentes, Homo sapiens (hombre), Mus musculus (ratón) y Caenorhabditis elegans (nematodo). El alineamiento entre estas secuencias muestra el alto grado de conservación de la proteína beta-actina citoplasmática entre especies. Los asteriscos indican 100% de homología en esa posición entre las especies comparadas. La numeración corresponde al último aminoácido representado según la secuencia de referencia contenida en el GeneBank (refs: Hs: X00351. Mm: NM_007393.1. Ce: NM_073416.1). Parte central de la figura: detalla la secuencia nucleotídica de los extremos de los exones 2 y 3 que flanquean el intrón B (región W) en las especies citadas. Los exones muestran la secuencia nucleotídica en las tres especies comparadas, divididas en sus correspondientes codones y el residuo aminoacídico que codifican se muestra debajo. Los asteriscos corresponden a las posiciones nucleotídicas que se conservan en un 100% entre las especies comparadas. Parte inferior de la figura: detalla la secuencia nucleotídica completa del intrón B (región divergente W) en las tres especies comparadas, a modo de ilustración de la divergencia utilizada para la identificación de la especie en esta invención.

La figura 4 muestra un esquema ilustrativo del proceso de identificación taxonómica propuesto en esta invención, a partir de una mezcla biológicamente heterogénea. La muestra biológica se procesa para extraer el DNA y someterlo a amplificación por PCR. En el caso ilustrado se amplifica la región W con los primers P1 y P2. El resultado de la PCR se visualiza en una electroforesis de agarosa estándar (ver gel de electroforesis, carril izquierdo: marcador de peso molecular, 100 bp ladder. Carril derecho: bandas (A y B, con peso molecular aproximado expresado en pares de bases bp, resultantes de la PCR de la muestra biológica). Las bandas se aíslan del gel y se purifican previo a su secuenciación de DNA por métodos estándares. Las secuencias de DNA obtenidas de cada una de las bandas se utilizan para interrogar una base de datos informática que incluye las secuencias de la región W de especies biológicas. La comparación de las secuencias obtenidas con las existentes en la base de datos provee el resultado de la identificación de la especie (o especies)

contenidas en la muestra biológica de origen.

- La figura 5 muestra un diagrama de flujo que ilustra el proceso informático para la identificación de las especies contenidas en un muestra biológica analizada. Las
- 5 secuencias de DNA obtenidas de los dos fragmentos de la región W en el experimento ilustrado en la figura 4 se utilizan para interrogar una base de datos de secuencias de DNA de la región W adscritas a especies concretas. La base de datos mostrada en este caso es resumida y contiene 11 especies diferentes a modo de ilustración. (Sequence 3: Cf, *Canis familiaris*, perro. Sequence 4: Us, *Ursus species*,
- 10 Oso. Sequence 5: Oa, *Ovis aries*, cabra. Sequence 6: Fc, *Felis catus*, gato. Sequence 7: Hs, *Homo sapiens*, hombre. Sequence 8: Ec, *Equus caballus*, caballo. Sequence 9: Oc, *Oryctolagus cuniculus*, conejo. Sequence 10: Rn, *Rattus norvegicus*, rata. Sequence 11: Mm, *Mus musculus*, ratón. Sequence 12: Dm, *Drosophila melanogaster*, mosca del vinagre. Sequence 13: Ce, *Caenorhabditis*
- 15 *elegans*, nematodo). Las comparaciones que resultan con 100% de homología, en el caso ilustrado 1:5 y 2:8, muestran identidad con las secuencias incluidas en la base de datos y confirman la procedencia de la muestra biológica de origen, una mezcla de cabra y caballo.
- 20 La figura 6 muestra una ilustración de la divergencia en peso molecular y en secuencia nucleotídica de la región W de algunas de las especies biológicas incluidas en la base de datos. Us, *Ursus species*. Oa, *Ovis aries*. Cf, *Canis familiaris*. Hs, *Homo sapiens*. Ec, *Equus caballus*. Oc, *Oryctolagus cuniculus*. Rn, *Rattus norvegicus*. Mm, *Mus musculus*.
- 25 La figura 7 muestra un ejemplo experimental de una electroforesis de agarosa correspondiente a diez amplificaciones independientes por PCR de la región W comprendida entre los primers P1 y P2 a partir de sangre periférica de ocho especies animales diferentes. Los números sobre cada carril indican el peso molecular
- 30 aproximado, expresado en pares de bases (bp), obtenido para la región W en cada una de las amplificaciones. Se observa la diferencia en peso molecular de esta región entre las especies animales incluidas. Oc: *Oryctolagus cuniculus*, conejo. Cf: *Canis familiaris*, perro. Fc: *Felis catus*, gato. Us: *Ursus species*, Oso. Ec: *Equus caballus*, caballo. Pt: *Pan troglodytes*, chimpancé. Oa: *Ovis aries*, cabra. Hs: *Homo sapiens*, hombre. Los carriles de la izquierda del gel corresponden al patrón de peso
- 35 molecular 100 bp ladder (Invitrogen). En este patrón, la banda más baja corresponde

- 11 -

a 100 bp y cada banda, en dirección ascendente, es 100 bp mayor que la inmediatamente anterior.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES PARTICULARES

5

Identificación de una especie a partir de una muestra biológica homogénea / heterogénea.

10 Se ilustra a continuación el proceso desarrollado para la identificación taxonómica de una muestra biológicamente heterogénea de composición desconocida. El esquema de trabajo sería el mismo si se trata de una muestra homogénea ya que siempre se parte de un desconocimiento total en cuanto a número de especies y/o subespecies diferentes presentes y en cuanto a la naturaleza taxonómica en sí misma.

15 Procesado de la muestra

Se realizó la extracción de DNA genómico para su posterior amplificación por PCR de una muestra de 200 µl de sangre venosa total en EDTA, compatible con cualquier kit comercial de extracción rápida.

20

El DNA genómico obtenido se sometió a amplificación por PCR. Se amplificó la región W (Figura 1) con los primers diseñados contra las posiciones nucleotídicas 1132-1151 (P1, forward primer, 5'TCCGGCATGTGCAAGGCCGG3' y 1474-1454 (P2, reverse primer, 5'CTCCATGTCTGTCCTCCAGTTGG3'), de acuerdo con la

25 secuencia humana M10277. La condiciones de PCR fueron las siguientes: reactivos estándar, paso inicial de desnaturalización a 94°C 3 minutos seguido de 35 ciclos de dos pasos cada uno a 94°C 10 segundos y 68°C 2 minutos.

Primera aproximación: identificación por peso molecular

30

El resultado de la PCR se visualizó por electroforesis horizontal estándar de agarosa al 3% en tampón TBE. La bandas obtenidas se compararon con un patrón de peso molecular 100 bp ladder-marker de Invitrogen. La figura 4 muestra los resultados obtenidos. La comparación de la movilidad de los fragmentos amplificados en el gel
35 con el marcador de peso molecular demuestra un peso molecular de aproximadamente 371 y 304 pares de bases. Si se comparan los pesos moleculares

de las bandas obtenidas con una base de datos de tamaños moleculares obtenida a priori, es posible hacer una primera aproximación en la identificación de las especies presentes en la muestra de partida. La figura 7 corresponde a un pool de diez amplificaciones independientes por PCR de la región W comprendida entre los primers P1 y P2 a partir de sangre periférica de ocho especies animales diferentes. Se observa la diferencia en peso molecular de esta región entre las especies animales incluidas. Oc: *Oryctolagus cuniculus*, conejo. Cf: *Canis familiaris*, perro. Fc: *Felis catus*, gato. Us: *Ursus species*, Oso. Ec: *Equus caballus*, caballo. Pt: *Pan troglodytes*, chimpancé. Oa: *Ovis aries*, cabra. Hs: *Homo sapiens*, hombre. Los carriles de la izquierda del gel corresponden al patrón de peso molecular 100 bp ladder (Invitrogen). En una primera aproximación por comparación con esta base de datos de pesos moleculares, las bandas obtenidas en la figura 4 corresponderían a cabra (banda de 371 bp) y caballo (banda de 304 bp).

15 Segunda aproximación: identificación por secuencia de DNA

En una segunda aproximación, se procede a la identificación de las dos bandas obtenidas mediante secuenciación de su DNA. Se purificaron las bandas con el kit Concert Rapid PCR Purification System de Life Technologies para proceder a la secuenciación de su DNA. La secuenciación se realizó de forma cíclica en las dos direcciones con los mismos primers utilizados en la PCR inicial según los protocolos y reactivos del sistema automático de secuenciación ABI-Prism 310 de Applied Biosystems. Las dos secuencias obtenidas se utilizaron para interrogar una base de datos propia de secuencias de DNA de la región W del gen de la beta-actina citoplasmática de varias especies utilizando el programa ClustalW del European Bioinformatic Institute del EMBL (www.ebi.ac.uk) o un programa equivalente accesible en red (Figura 5). Las comparaciones resultaron en un 100% de homología en el caso ilustrado 1:5 y 2:8 y confirmaron la procedencia de la muestra biológica de origen, una mezcla de cabra y caballo.

REIVINDICACIONES

1. Método para la identificación de especies biológicas a partir de muestras de material biológico cuya procedencia es una única especie o una mezcla heterogénea de especies y/o subespecies caracterizado porque comprende: (A) extracción del
5 DNA de la muestra; (B) amplificación por PCR o técnica equivalente de segmentos del gen de la beta-actina citoplasmática; (C) identificación del segmento amplificado por comparación de su tamaño en pares de bases con un patrón de tamaños preestablecido y/o identificación del segmento amplificado por secuenciación de DNA
10 y comparación de la secuencia resultante con la secuencia específica de cada especie o subespecie presente en una base de datos informática.
2. Método según la reivindicación 1 caracterizado porque en el paso de amplificación por PCR o técnica equivalente, se amplifica cualquier segmento del gen de la beta-
15 actina citoplasmática.
3. Método según la reivindicación 2 caracterizado porque en el paso de amplificación por PCR o técnica equivalente, se amplifican segmentos génicos de regiones divergentes del gen de la beta-actina citoplasmática a partir de secuencias de DNA
20 con alta conservación evolutiva entre especies y subespecies.
4. Método según la reivindicación 2 caracterizado porque en el paso de amplificación por PCR o técnica equivalente, los segmentos a amplificar son aquellos comprendidos entre la secuencia 3' del exón anterior y la secuencia 5' del exón
25 posterior comprendiendo toda la secuencia intrónica y parte de las secuencias exónicas flanqueantes.
5. Método según la reivindicación 2 caracterizado porque la región o regiones a amplificar se seleccionan del grupo que consiste en las regiones comprendidas entre
30 las posiciones 1130-1473, 1452-2063, 2438-2680 y 2642-2960, numeración con respecto a la secuencia de DNA del locus humano HUMACCYBB Accession number M10277.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 caracterizado por el uso de
35 una composición de primers universales que hibridan con las regiones nucleotídicas más conservadas del gen de la beta-actina citoplasmática.

- 14 -

7. Método según la reivindicación 6, caracterizado porque los primers universales hibridan con las secuencias comprendidas entre las posiciones 1130-1191 y 1453-1473, numeración con respecto a la secuencia de DNA del locus humano
- 5 HUMACCYBB Accession number M10277.
8. Método según la reivindicación 6, caracterizado porque los primers universales hibridan con las secuencias comprendidas entre las posiciones 1453-1473 y 2041-2065, numeración con respecto a la secuencia de DNA del locus humano
- 10 HUMACCYBB Accession number M10277.
9. Método según la reivindicación 6, caracterizado porque los primers universales hibridan con las secuencias comprendidas entre las posiciones 2433-2459 y 2643-2680, numeración con respecto a la secuencia de DNA del locus humano
- 15 HUMACCYBB Accession number M10277.
10. Método según la reivindicación 6, caracterizado porque los primers universales hibridan con las secuencias comprendidas entre las posiciones 2643-2680 y 2940-2960, numeración con respecto a la secuencia de DNA del locus humano
- 20 HUMACCYBB Accession number M10277.
11. Método según la reivindicación 6, caracterizado porque los primers universales se seleccionan del grupo que consiste en: P1 (1132-1151)
5'TCCGGCATGTGCAAGGCCGG3', P2 (1474-1454)
- 25 5'CTCCATGTCTGCCAGTTGG3', P3 (1453-1484)
5'ACCAACTGGGACGACATGGAGAAGATCTGGC3', P4 (2063-2034)
5'TACATGGCNGGGGTGTTAAAGGTCTCAAAC3', P5 (2434-2463)
5'TGCCCTGAGGCCCTCTTCCAGCCTTCCTTC3', P6 (2681-2643)
5'GGGTACATGGTGGTGCCGCCAGACAGCACNGTGTTGGC3', P7 (2643-2681)
- 30 5'GCCAACACNGTGCTGTCTGGCGGCACCACCATGTACCC3' y P8 (2952-2932)
5'TCGTACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTG3'.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 caracterizado porque las muestras son de origen biológico.
- 35
13. Método según la reivindicación 12 caracterizado porque las muestras son de

- 15 -

tejido de caballo, cabra, conejo, perro, gato, chimpancé, humano y/o oso pardo.

14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 caracterizado porque en el paso de identificación, el/los segmento/s amplificado/s es/son comparado/s con las
5 secuencias de estas mismas regiones génicas de especies incluidas en una base de datos informática.

15. Uso de las secuencias de DNA del gen de la beta-actina citoplasmática de muestras biológicas de una única especie de procedencia o de una mezcla
10 heterogénea de especies y/o subespecies, para la identificación de las especies biológicas a las que pertenecen las muestras.

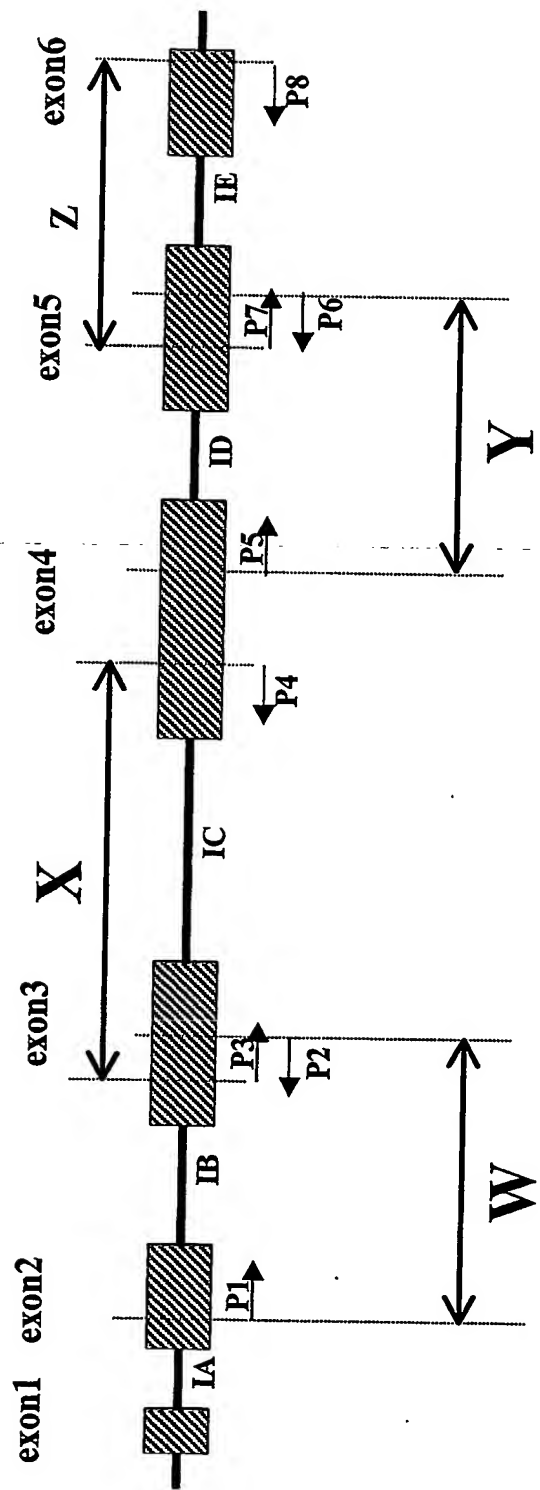
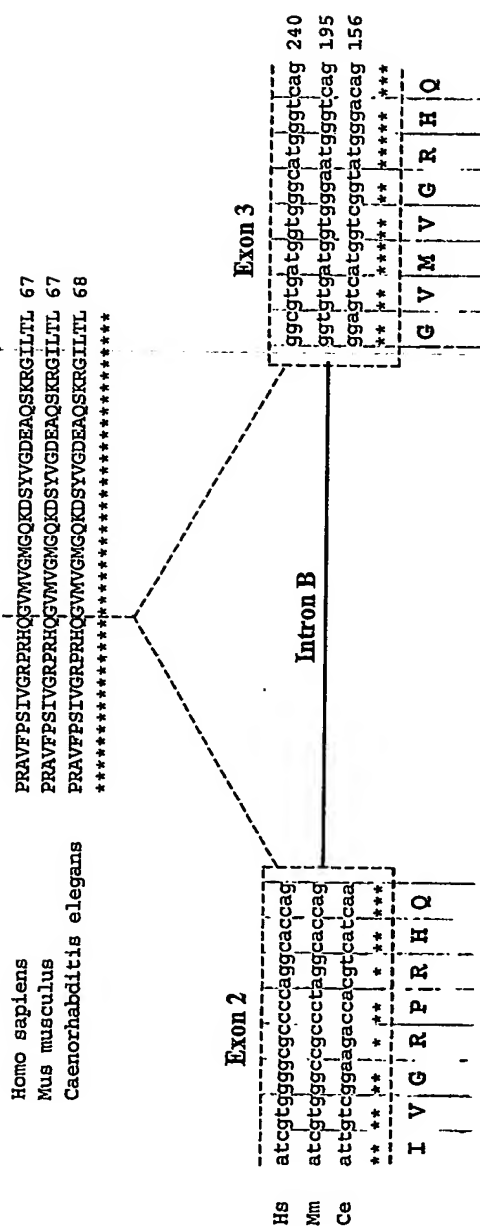


FIG. 1

2/7

P1 (1132-1151)	5' TCCGGCATGTGCAAGGCCGG 3'
P2 (1474-1454)	5' CTCCATGTCGTCCCAGTTGG 3'
P3 (1453-1484)	5' ACCAACTGGGACGACATGGAGAAGATCTGGC 3'
P4 (2063-2034)	5' TACATGGCNGGGGTGTTAAAGGTCTCAAAC 3'
P5 (2434-2463)	5' TGCCCTGAGGCCCTCTTCCAGCCTTCCTTC 3'
P6 (2681-2643)	5' GGGTACATGGTGGTGCCGCCAGACAGCACNGTGTTGGC 3'
P7 (2643-2681)	5' GCCAACACNGTGCTGTCTGGCGGCACCACCATGTACCC 3'
P8 (2952-2932)	5' TCGTACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTG 3'

FIG. 2



Hs Intron B

gtagggggagctggctgggtggggcagccccgggagggggcgggagggcgtttctctgca
caggagcctcccggtttccggggctggctgcgcctgctcagggtctctgtccttcttccag

***Mm*: Intron B**

gtaagtgaactgttggcactttgggagtaagcctgggggtttctcttggggatcgatgcccgtgctaagaaggctgttc
ccttcacag-

Ce Intron B

ggtaaataataacattcgcgatgattaaattatgcgtactatttcagga

FIG. 3

4/7

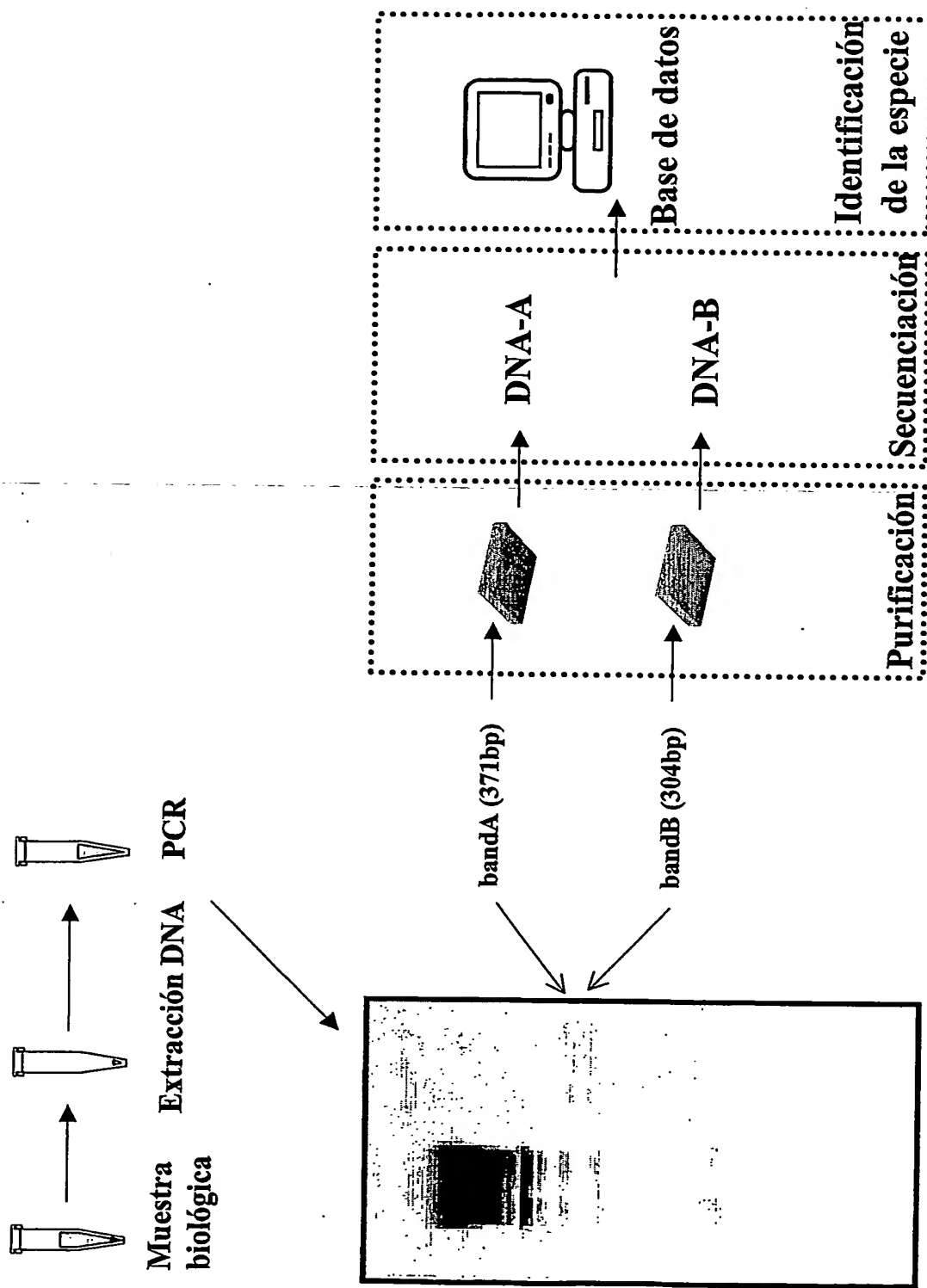


FIG. 4

5/7

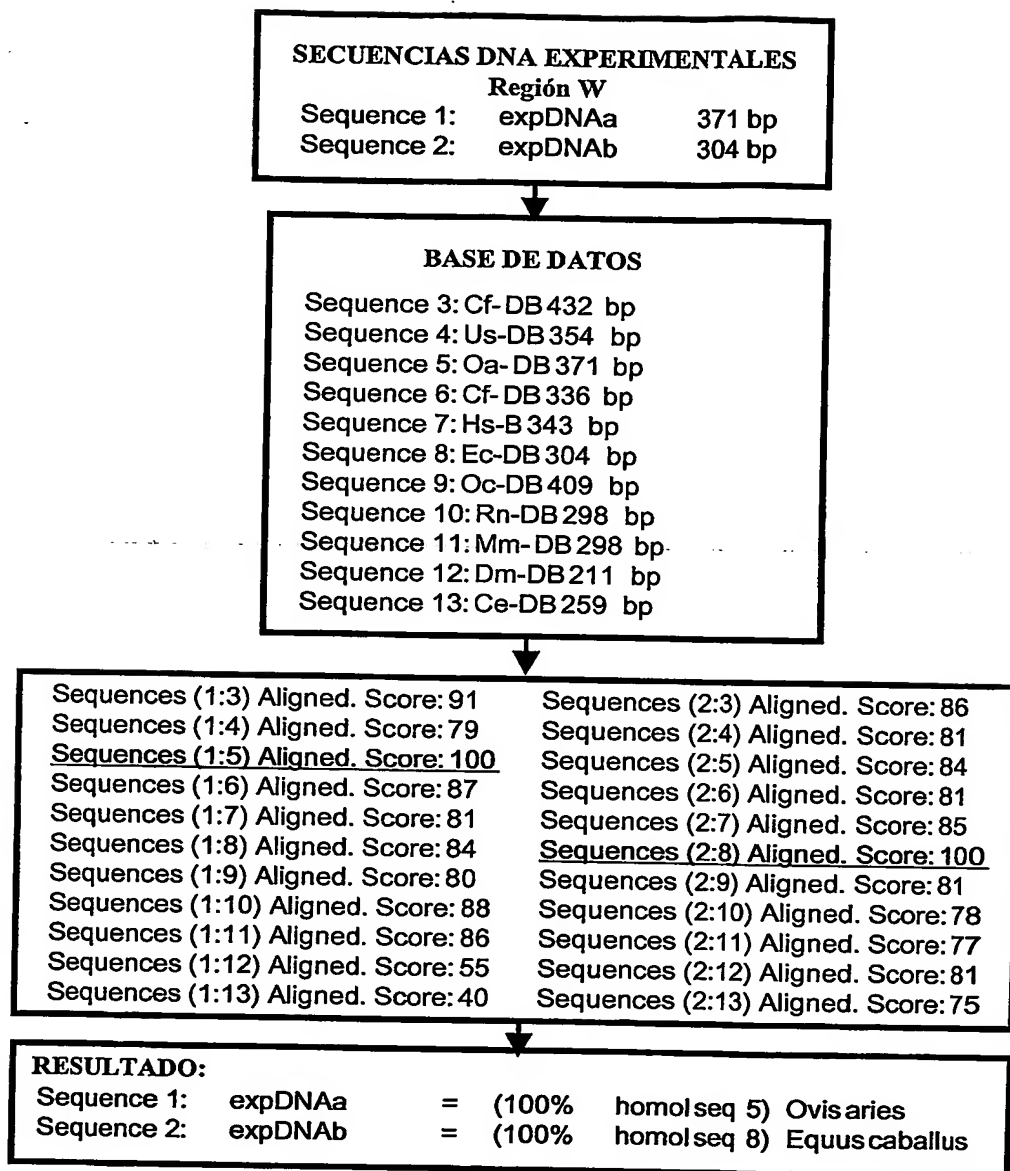


FIG. 5

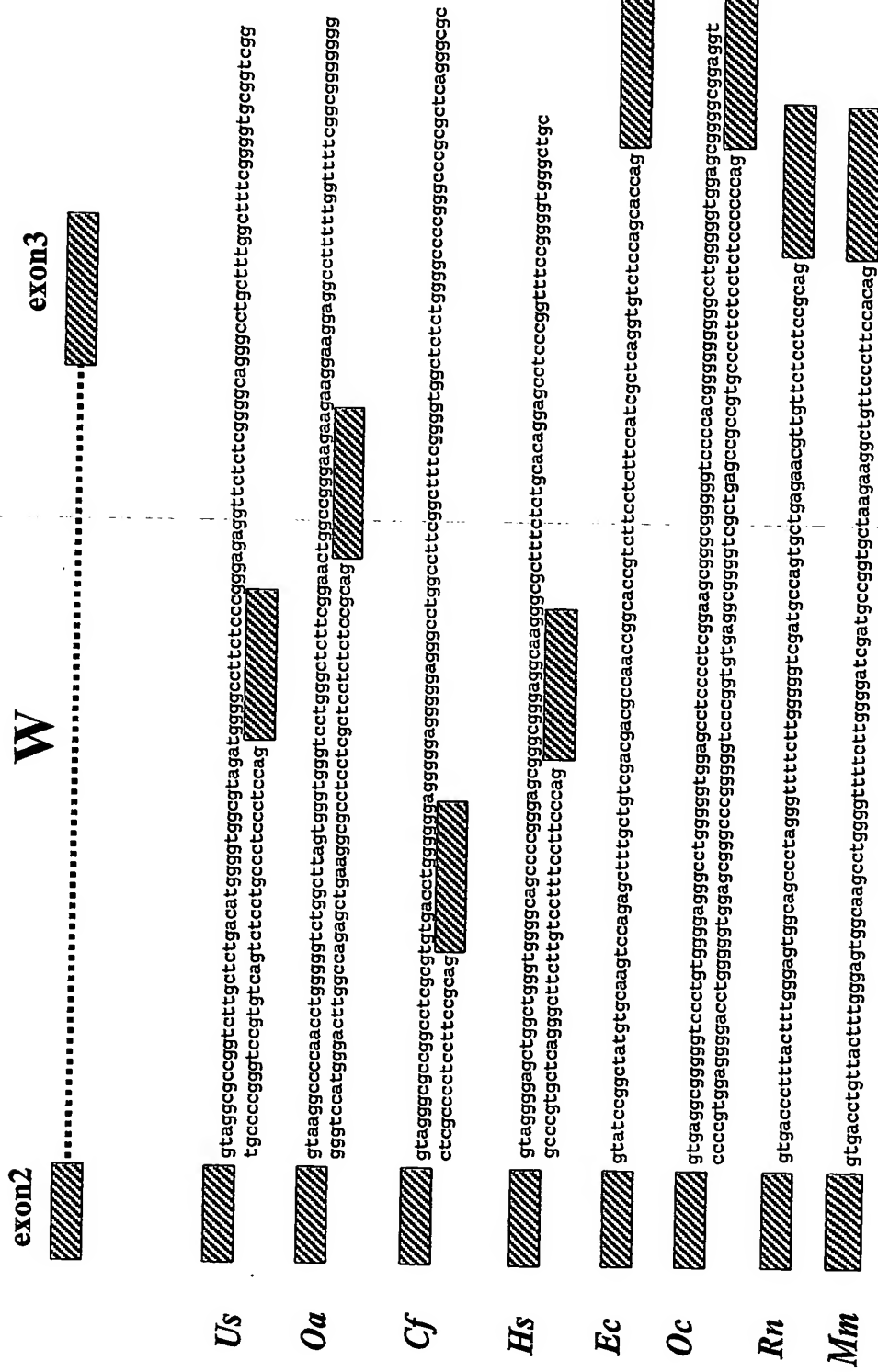
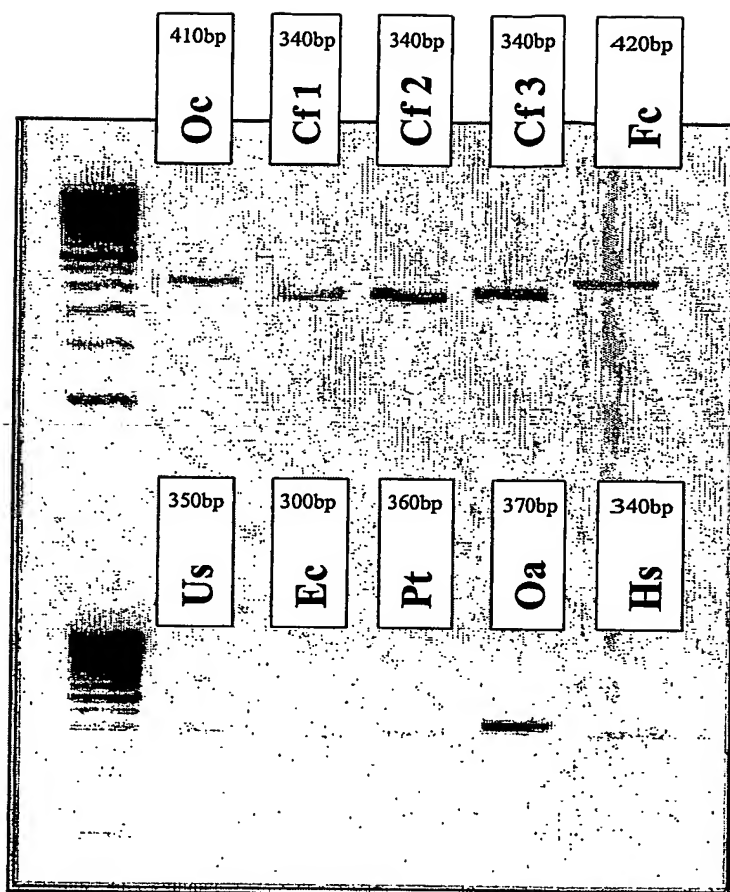


FIG. 6

7/7

**FIG. 7**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2003/000547

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, BIOSIS, REGISTRY, HCAPLUS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BELLIS C. et al. A molecular genetic approach for forensic animal species identification. Forensic Science International. 8.07.2003. Vol 134, N° 2-3 pages 99-108, Figure 1	1-4, 12-15
Y	LOCKLEY K. et al. Intron variability in an actin gene can be used to discriminate between chicken and turkey DNA. Meat Science. 2002. Vol 61. pages 163-168	1-15
Y	SADAYO NAKAJIMA-IIJIMA et al. Molecular structure of the human cytoplasmic B-actin gene: Interspecies homology of sequences in the introns. Proc. Natl. Acad. Sci. Septiembre 1985. Vol 82, N°18, pages 6133-6137	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

03 June 2004 (03.06.2004)

Date of mailing of the international search report

18 JUN 2004 18.06.2004

Name and mailing address of the ISA/

S.P.T.O.

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2003/000547

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KOCHER T D et al. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. Proc. Nat. Acad. Sci. 1989 Vol 86, Nº 16, pages 6196-6200	1-15
A	RODRIGUEZ MIGUEL A. et al. Qualitative PCR for the detection of chicken and pork adulteration in goose and mule duck foie gras. Journal of the Science of Food and Agriculture. Septiembre 2003. Vol 83, Nº11, pages 1176-1181	1-15

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 2003/000547

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁷ C12Q1/68

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

CIP⁷ C12Q

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, BIOSIS, REGISTRY, HCAPLUS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	BELLIS C. et al. A molecular genetic approach for forensic animal species identification. Forensic Science International. 8.07.2003. Vol 134, Nº 2-3 páginas 99-108. Figura 1	1-4, 12-15
Y	LOCKLEY K. et al. Intron variability in an actin gene can be used to discriminate between chicken and turkey DNA. Meat Science. 2002. Vol 61. páginas 163-168.	1-15
Y	SADAYO NAKAJIMA-IJIMA et al. Molecular structure of the human cytoplasmic B-actin gene: Interspecies homology of sequences in the introns. Proc. Natl. Acad. Sci. Septiembre 1985. Vol 82, Nº18, páginas 6133-6137	1-15

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

03 Junio 2004 (03.06.2004)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

18 JUN 2004 18.06.2004

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.

Nº de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

J. Manso Tomico

Nº de teléfono + 34 91 3495583

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES 2003/000547

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	KOCHER T D et al. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. Proc. Nat. Acad. Sci. 1989 Vol 86, Nº 16, páginas 6196-6200.	1-15
A	RODRIGUEZ MIGUEL A. et al. Qualitative PCR for the detection of chicken and pork adulteration in goose and mule duck foie gras. Journal of the Science of Food and Agriculture. Septiembre 2003. Vol 83, Nº11, páginas 1176-1181.	1-15

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.